植 物 分 类 与 资 源 学 报 2011, 33 (5): 529～534
Plant Diversity and Resources DOI: 10.3724/SP.J.1143.2011.11064

小桐子 EST-SSR 分子标记的开发与种质遗传多样性分析*

杨 春[1,2], 刘爱忠[1**]
(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 小桐子 (*Jatropha curcas*) 适应性强, 不择土壤, 种子油脂性能适宜生物柴油的生产, 是重要的生物柴油植物。基于小桐子种子发育过程中的 EST 序列, 采用生物信息学方法, 从 4640 个 EST 非冗余序列上鉴别了 1009 个 SSR 位点并分析其分布特征; 开发了 11 对多态的 EST-SSR 分子标记, 并利用这些分子标记调查了 24 个不同地理种源的遗传多样性, 从每个位点的等位基因数目 (2～3, 平均为 2.45)、期望杂合度 (*He* 为 0.0887～0.5128, 平均是 0.2736)、多态信息含量 (PIC 为 0.0847～0.4031, 平均是 0.2313) 等方面反映了小桐子种质的遗传多样性低。进一步分析显示不同地理种源的遗传关系缺乏明显的地理结构。作者开发的 EST-SSR 分子标记不仅有助于小桐子种质的遗传多样性研究, 也有助于小桐子种质间的遗传关系鉴别。

关键词: 小桐子; 生物柴油植物; EST-SSR; 遗传多样性
中图分类号: Q 78 **文献标识码**: A **文章编号**: 2095-0845(2011)05-529-06

Development of EST-SSR Markers from *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and Their Application in Genetic Diversity Analysis among Germplasms

YANG Chun[1,2], LIU Ai-Zhong[1**]
(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Mengla 666303, China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) has created tremendous interest all over the world for the use of its seed oil as a commercial source of biodiesel. Based on 9843 ESTs available from the developing seeds of *Jatropha curcas*, we identified 1009 SSRs in 4640 unigenes and developed 11 polymorphic EST-SSR markers which exhibited a low level of genetic diversity among germplasms, i.e. allele number varied from 2 to 3, with a average of 2.45; Heterozygosity (*He*) ranged from 0.0887-0.5128, with a average of 0.2736; Polymorphic Information Content (PIC) ranged from 0.0847-0.4031, with a average of 0.2313. Further, we analyzed the genetic relationships among 24 germplasms collected from different areas in southern China, northern Vietnam, and India using the 11 EST-SSR markers. The results showed that there was no a geographic pattern of genotypes across the collection areas of *Jatropha curcas*. The EST-SSR markers developed in current study is useful for both genetic diversity analysis and identification of genetic relationships among germplasms in *Jatropha curcas*.

Key words: Biodiesel plant; EST-SSR; Genetic diversity; *Jatropha curcas*

小桐子 (*Jatropha curcas* L.) 又名麻疯树或膏桐, 属大戟科落叶灌木或小乔木, 原产热带美洲,

---

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871548)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: liuaizhong@xtbg.ac.cn; Fax: 0871-5160916; Tel: 0871-5140420
收稿日期: 2011-04-18, 2011-05-19 接受发表
作者简介: 杨春 (1985-) 男, 硕士研究生, 主要从事植物遗传与育种研究。

现在我国云南、海南、四川、广东、广西和贵州有少量栽培或逸生（丘华兴，1996；陈冀胜和郑硕，1987）。小桐子易于繁殖，不择土壤，能生长在大量的非农业用地、退耕还林地、路边坡地或荒山荒地。其生长快速，种植当年或次年可开花结果，三年后进入盛果期（Foidl 等，1996）。小桐子种子油脂通过简单的加工即可得到优于目前0号柴油的生物柴油，在当今生物柴油植物种质资源开发过程中，利用小桐子作为生物柴油树种具有巨大的开发潜力，受到国内外的高度关注（Gübitz 等，1999；Foidl 等，1996；Fairless，2007）。然而，由于小桐子栽培历史短，种子产量相对较低、种子含油量不稳定等因素，严重限制了小桐子的产业化种植。培育优质高产、稳产、适宜规模化种植的栽培品种是发展小桐子生物柴油产业的先决条件。

开发分子标记调查小桐子不同地理种质的遗传多样性以及遗传关系，是培育优质小桐子品种的前提。利用 RAPD、ISSR、SPAR、AFLP 等分子标记调查小桐子不同地理种的遗传多样性已有一些报道（Basha 和 Sujatha，2007；Ranade 等，2008；Sun 等，2008；Tatikonda 等，2009），这些报道表明小桐子不同地理种源或居群水平上的多态性水平较低。近年来，随着基因组学的发展，GenBank 储存了大量公共可以获取的 DNA 和 EST 序列，利用这些序列，鉴别 SSR 位点，开发 SSR 分子标记为物种的居群遗传或分子育种提供了重要的工具，特别是利用 EST 序列开发 SSR 分子标记（EST-SSR），不仅能够用于调查居群水平的遗传多样性，而且由于 EST-SSR 标记容易和性状连锁，已广泛用于作物重要农艺性状的 QTL 研究，如小麦和水稻（Cardle 等，2000；Morgante 等，2002；Nicot 等，2004）和拟南芥（Tóth 等，2000）等。Wen 等（2010）利用大戟科木薯（*Manihot esculenta*）EST-SSR 标记的转移性，开发了能够用于小桐子遗传多样性分析的36 对标记。至今，在小桐子 EST-SSR 分子标记的开发和利用方面的研究非常有限。

本文基于小桐子 EST 序列，利用生物信息学方法，鉴别 EST 序列上的 SSR 位点并分析其分布特点，开发 EST-SSR 分子标记，以调查小桐子不同种质的遗传关系。这些研究为进一步研究小桐子的居群遗传、种质遗传多样性及重要农艺性状的 QTL 提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于检测小桐子 SSR 位点的 EST 序列是 GenBank 已有的来自种子发育不同时期的两个 cDNA 文库，共 9843 条 EST 序列，其序列号为：FM887038-FM896881；用于检测 EST-SSR 引物多态性的小桐子种源收集于云南西双版纳、海南三亚、四川会理、越南凉山和印度旁遮普地区，共24 个种源，种源收集后种植在中国科学院西双版纳热带植物园小桐子种质收集区（表1）。

1.2 研究方法

1.2.1 EST 序列上 SSR 位点的鉴定和引物设计

EST 序列的拼接与 SSR 位点的鉴定：用 EST-TRIMMER 软件（http://www.pgrc.ipk-gather sleben.de/misa/download/est-trimmer.pl）按序列 5′端或 3′端 T 或 A 连续重复五次以上的末端序列、总长小于 100 bp 的序列等标准，剪切或删除序列；总长大于 800 bp 的片段，按 800 bp 的长度剪切掉 3′端其余序列。为了除去 EST 中的冗余序列，用 CD-HIT 软件（Li 和 Godzik，2006：http://bioinformatics.ljcrf.edu/cd-hit/）将剪切后的 EST 序列，按末端序列相似性大于 95% 的标准进行拼接。然后，在去除

表1 小桐子不同地理种源的收集和取样数

Table 1 Germplasm collection and samples used in this study

种质来源 Sources	种质收集号 Accession No.	取样数 Sample No.	图2 中个体代码 Code in Fig.2
四川会理地区（Sichuan，China）	JC-SC-Huili01-06	6	S1，S2，S3，S4，S5，S6
海南三亚地区（Hainan，China）	JC-HN-Sanya01-06	6	H1，H2，H3，H4，H5，H6
云南西双版纳地区（Yunnan，China）	JC-YN-Mengla01-06	6	Y1，Y2，Y3，Y4，Y5，Y6
印度旁遮普地区（India）	JC-ID01-04	4	In1，In2，In3，In4
越南北部地区（Vietnam）	JC-VN01-02	2	J1，J2

冗余后的 EST 序列上进行 SSR 位点检测，用 MIcroSAtellite（MISA，http://www.pgrc.ipk-gatersleben.de/misa）软件，按照单碱基重复大于 10、二碱基重复大于 5、三/四/五/六碱基重复大于 4 的标准，鉴别所有 SSR 位点。

引物设计：运用 Primer 3 软件（http://frodo.wi.mit.edu/primer3/），在含有 SSR 位点（不包括单碱基位点）的 EST 序列上设计引物，按照最适 Tm = 60℃，引物长度为 20 ~ 22 bp，产物长度为 100 ~ 300 bp，正反引物包含 SSR 区域等标准设计引物。筛选出 160 对送交上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2　小桐子 EST 序列上 SSR 位点的多态性检测

DNA 提取：以小桐子嫩叶为材料，用 CTAB 法（Doyle 和 Doyle，1987）提取每个样品的基因组 DNA，紫外分光光度计测定浓度及纯度，1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量，最后统一稀释 DNA 浓度至 50 ~ 100 ng·μL^{-1}，备用。

PCR 扩增：用 20 μL 的反应体系，包含 Taq 酶 1 U，10×Buffer 2 μL，模板 DNA 1 μL，10 mmol·L^{-1} dNTP 2 μL，正反引物（10 ng·μL^{-1}）各 0.5 μL，25 mmol 的 $MgCl_2$ 0.5 μL，加水补齐至 20 μL。扩增程序为：95℃ 3 min，30 个循环（95℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 1 min），72℃ 7 min，4℃保存。

PCR 产物的多态性检测：PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离后，用硝酸银染色 20 min，清洗、显影，对照 20 bp 的标样，鉴定等位基因的数目（Alleles number，An）和片段大小。等位基因的多态性用期望杂合度（heterozygosity，*He*）和多态信息含量（Polymorphic Information Content，PIC）来表示，分别用 Genepop（http://genepop.curtin.edu.au）和 PIC Calculator（http://www.genomics.liv.ac.uk/animal/Pic1.html）在线软件计算。每个位点 Hardy-Weinberg equilibrium（HWE）检验和位点间的连锁不平衡（linkage disequilibrium，简称 LD）检验也是通过 Genepop 软件来完成。

1.2.3　不同地理种源小桐子的遗传关系分析

用数字 1 或 0 量化某一等位基因的表达或缺失（表达记为 1，缺失记为 0），根据小桐子二倍体等位基因的纯合或杂合规律，编辑数码矩阵，利用 NTSYS PC 2.11 分析软件（Applied Biostatistics Inc，Setauket，USA），按照 Jaccards 遗传相似系数为标准，用非加权类平均法（un-weighted pair-group method using arithmetic averages，UPGMA）构建小桐子种内遗传关系聚类图。

2　研究结果

2.1　小桐子 EST 序列上 SSR 位点的分布特点

9843 条 EST 序列经过除冗余和拼接后，获得 4640 条无冗余序列（包括 contigs 1155 条，singletons 3510 条），序列总长约 2.11 Mb，占整个小桐子基因组长度 416 Mb（Carvalho 等，2008）的 0.5%。总共鉴别出 SSR 位点 1009 个，含有 SSR 位点的 EST 序列 811 条（17.5% 的 EST 序列含有 SSR 位点）。其中 161 条序列含有两个以上的 SSR 位点，935（92.7%）个位点是简单的重复类型（simple repeat motifs），74（7.3%）个是复合重复类型（compound repeat motifs）。SSR 位点的频度为每 2.14 kb 序列上含有 1 个 SSR 位点。分析 SSR 位点的组成显示，单碱基重复为 358（占总位点的 35.5%）、二碱基重复为 328（占总位点的 32.5%）、三碱基重复为 282（占总位点的 27.8%）、其它的碱基重复为 42（占总位点的 4.2%）。单碱基重复主要由 A/T 组成（占 98.04%）；二碱基重复中 AG/CT 的出现频率最高（占 53.7%），AT/TA 的出现频率次之（占 38.1%）；三碱基重复中 AAG/CTT 的出现频率最高（占 28.1%），AAT/ATT 的出现频率次之（占 17.4%）。进一步分析 SSR 位点碱基重复单元的重复规律（图 1，不包括单碱基重复单元）可以看出，大于 7 次重复后 SSR 位点的数目显著减少。

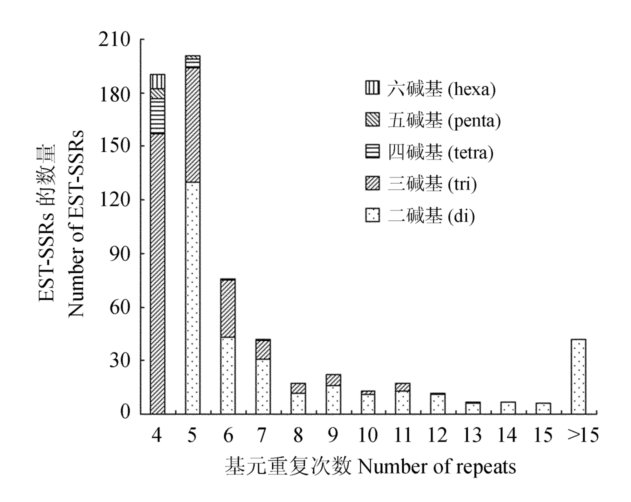


图 1　4640 个小桐子非冗余 EST 序列上 SSR 位点不同基元（二、三、四、五、六碱基）重复次数的分布规律

Fig. 1　Distribution of motif repeat counts (di-, tri-, tetra-, penta- and hexa-) for SSRs identified in 4640 unigenes from the EST database of *Jatropha curcas*

2.2　小桐子 EST-SSR 标记的多态性检测

利用 24 个不同地理种源，筛选、检测 160 对 SSR 引物的多态性，PCR 结果显示 109 对引

物能够在所有个体（或绝大多数个体）中扩增出清晰的条带，其余51对引物不能扩增出清晰条带（或不能在大多数个体扩增出条带，或PCR产物太弱）。多态性检测显示11对引物具有多态（引物的多态率为10%），该11对引物共检测出27个等位基因，平均每个SSR位点的等位基因数为2.45；*He* 的变化范围为0.0887～0.5128，平均为0.2736；PIC的变化范围为0.0847～0.4031，平均为0.2313（表2）。这些结果表明小桐子EST-SSR标记多态性较低。对11个SSR位点的HWE检验发现5个位点（Jc17、Jc21、Jc22、Jc38、Jc58）显著偏离（$P<0.01$）。LD检验的结果没有发现位点间的连锁现象。

2.3 小桐子不同地理种源的遗传关系

基于11对多态引物产生的27个等位基因，种质遗传多样性分析显示，24个不同地理种源生成5个类群（I–V），遗传相似系数为0.73～1（图2）。类群I包括了来自云南西双版纳地区的3个种源（Y1，Y4，Y5）、四川会理地区的3个种源（S1，S5，S6）、海南三亚地区的1个种源（H3）和印度旁遮普地区的1个种源（In3），其中Y4和Y5、S5和S6的遗传相似系数一致，等于1（即个体间没有遗传分化）；类群II包括了来自四川会理地区的1个种源（S2）、海南三亚地区的1个种源（H4）、越南凉山地区的2个种源（J1，J2）和印度旁遮普地区的1个种源（In2），其中S2和H4的遗传相似系数一致；类群III包括了来自四川会理地区的2个种源（S3，S4）、海南三亚地区的3个种源（H1，H2，H6）、云南西双版纳地区1个种源（Y6）和印度旁遮普地区的1个种源（In2），其中S4和In1、H2和H6的遗传相似系数一致；类群IV包括了来自云南西双版纳地区的2个种源（Y2，Y3）和印度旁遮普地区的1个种源（In4），其中Y2和Y3的遗传相似系数一致；类群V仅包括了海南的1个种源（H5），而且类群V和其它类群的相似性最低（相似系数为0.73）。这些结果可以看出，小桐子不同地理种源间没有明显的地理结构。

表2 小桐子EST-SSR多态标记的特征

Table 2 Characterization of EST-SSR markers developed in this study

Genbank 序列号 (ID)	引物代码 Primer ID	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）	重复基元 Repeat	片段大小 Allele size (bp)	产物大小 Allele size range (bp)	等位基因数 (An)	期望杂合度 (*He*)	多态信息含量 (PIC)
FM887106	JC16	F:ACTTAGTGTAGGTTGGCCTGGA R:CGCAGACCTTCCTCCTAGTTTA	(CAG)11	267	280-286	3	0.1512	0.1427
FM896040	JC17*	F: AACCCTCTTCAAAACCCTTCTC R: AGAAAGCTGAACCCATTATCCA	(TCT)10	335	335-341	3	0.2487	0.2327
FM895815	JC19	F: GTAGGAAACAAAGCCGAAGCTA R: GGGAACCAACAGAACAAAAGAG	(TA)9	344	326-347	3	0.1512	0.1427
FM888472	JC21*	F: CCTCAATATCAACCCAGCCTTA R: TGCATTGACTTTAAGCATCCAC	(AGA)9	354	355-361	3	0.3572	0.3136
FM895832	JC22*	F:ATTGATGAGCTCCTCTCCTTTG R: ACATGAATCCTAAAGCCCAGAA	(AG)9	383	307-309	2	0.4932	0.3716
FM893550	JC38*	F:GTCCATCTTAACAACAGGCACA R:GCCTGCATTCTCCTTACAATTT	(AG)7	236	319-325	3	0.5128	0.4031
FM892149	JC39	F:GAGCAAAAATGGCAAAGCTAAT R:GCTTCTGACCTTGTTCTCGACT	(ACC)7	223	230-239	2	0.1495	0.1384
FM896284	JC43	F: TTCAACAGGTTCAATCAACTGC R: TGCAGCTGGATGGTTGTTATAG	(GCA)6	164	173-176	2	0.2231	0.1982
FM896018	JC58*	F:GGTTTTGCCACCAATAGTCATT R:CAAACTGCTGCTTCAAGCTCTA	(GGT)5	372	379-382	2	0.447	0.3471
FM896284	JC132	F:TCCTGGCCATAATGGAAGTATT R:TGCAGCTGGATGGTTGTTATAG	(GCA)6	241	247-250	2	0.0887	0.0847
FM887601	JC137	F:TGCATATTCGCTGCTTGTTATC R:ATGCAAAAACGACAACACTGAC	(CAC)6	234	238-241	2	0.1875	0.1699
平均值 Average						2.45	0.2736	0.2313

注：* 表示该位点HWE检验显著偏离（$P<0.01$） Note: * Hardy-Weinberg disequilibrium was detected（$P<0.01$）

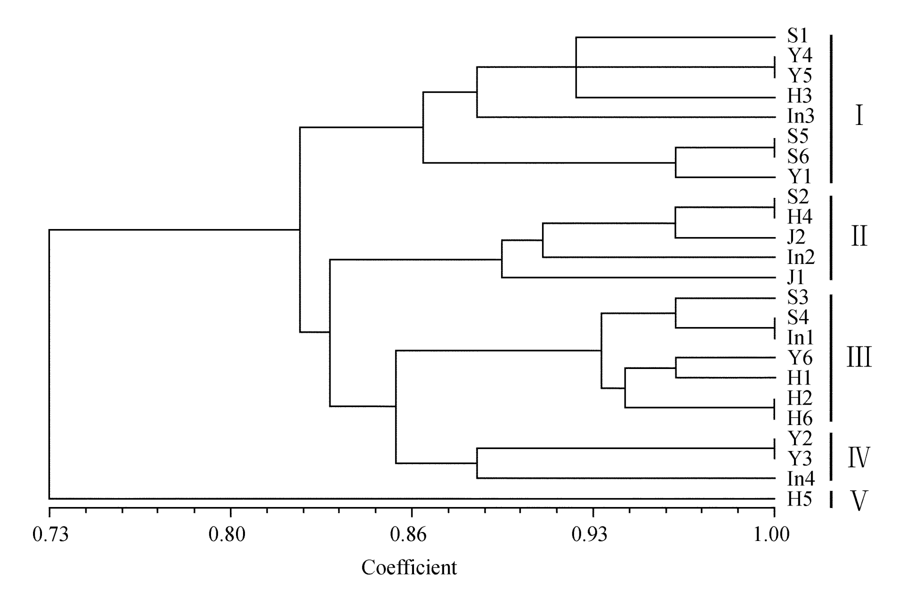


图 2　基于 Jaccards 遗传相似系数构建的 24 个小桐子不同地理种源遗传关系聚类图（样品代码见表 1）

Fig. 2　Genetic relationships among 24 germplasms of *Jatropha curcas* based on Jaccords similarity coefficient using genotypic data of 11 polymorphic EST-SSRs (see Table 1 for sample information)

3　讨论

本研究基于小桐子 4640 条非冗余 EST 序列，共检测出 1009 个 SSR 位点在 811 条序列上（17.5% 的 EST 序列含有 SSR 位点），每 2.14 kb 序列上含有 1 个 SSR 位点。在前面的研究中，我们用相同的 SSR 筛选标准发现 28.5% 的蓖麻 EST 序列含有 SSR 位点，每 1.77 kb 蓖麻 EST 序列上含有 1 个 SSR 位点（Qiu 等, 2010）。和蓖麻相比，小桐子 EST 序列上 SSR 位点的丰富度比蓖麻低。Yadav 等（2010）检测了小桐子叶、根尖、发育的种子 3 个 cDNA 文库的 EST 序列上 SSR 位点的丰富度，我们当前的结果和 Yadav 等的报道基本一致。Ellis 和 Burke（2007）检测的 33 个属植物 EST 序列上 SSR 位点分布的丰富度，结果显示不同植物基因组或 EST 序列含有 SSR 位点的数目、重复单元（motif）组成或重复次数等都有很大差异。形成这种差异的生物学原因至今尚不清楚，可能与物种的基因组大小有关（Varshney 等, 2002），也可能与特定物种的演化历史有关（Morgante 等，2002）。和其它 33 个属植物 EST 序列上 SSR 位点的丰富度相比，小桐子 EST 序列上 SSR 位点的丰富度属中等水平。

比较不同植物 EST 序列上 SSR 位点的组成可以发现，A/T 是单碱基重复位点的主要成分，占 90% 以上（小桐子 A/T 的比例在单碱基重复位点中占 98.04%）；AG/CT 是二碱基重复位点的优势单元，一般占 40% ~60% 之间（小桐子 AG/CT 的比例在二碱基重复位点中占 53.7%）；AAG/CTT 是三碱基重复位点的优势单元，一般占 20% ~30% 之间（小桐子 AG/CT 的比例在二碱基重复位点中占 28.1%）。为什么不同植物 EST 序列上 SSR 位点的组成有明显的偏爱性至今尚无令人信服的解释。

在 EST-SSR 引物的多态性检测方面，109 对引物中检测出 11 对多态引物（多态率为 10%），反映了小桐子 EST-SSR 引物的多态率低。Sun 等（2008）开发了 17 对基因组的 SSR 引物，在 58 个个体中进行多态性检测，结果发现只有 1 对（占 5.9%）具有多态性。本研究中，从 11 对多态引物在 24 个不同地理种源的多态性表现来看（表 2），每个位点的等位基因数（An）为 2 ~3 个（平均每个位点的等位基因数为 2.45），每个位点的期望杂合度（*He*）为 0.0887 ~0.5128（平均为 0.2736）。等位基因数和期望杂合度都是反映 SSR 位点等位基因在个体间的多样性程度，小桐子的等位基因数和期望杂合度的值反映了小桐子种质间的遗传多样性低。PIC 是反映了引物多态信息含量的水平，每个位点的等位基因数和它们

在种群中的分布频率决定了它的大小，通常是检测引物多态性的指标。小桐子不同种源的 PIC 为 0.0847～0.4031（平均为 0.2313），反映了这些引物的多态性较低。因此，从小桐子 EST-SSR 引物的多态率、An、*He* 和 PIC 的值都反映出小桐子种质间存在低的遗传多样性。

不同地理种源的遗传关系分析显示，11 对多态引物能够将 24 个种源分成 5 个聚类群，其中 H5 种源和其它种质分化最明显，而来自相同地区的 Y4 和 Y5、H2 和 H6、S5 和 S6、Y2 和 Y3，以及来自不同地区的 S2 和 H4、S4 和 In1 相互之间没有明显的分化。可能是这些种质具有相同的遗传背景，也可能是当前开发的 EST-SSR 标记多态性低，还不能将这些种质的遗传差异分离开来。此外，分成的 5 个聚类群没有明显的地理结构。Cai 等（2010）利用 ISSR 调查了我国小桐子种质资源的遗传多样性，发现我国现有的小桐子种质资源间的遗传关系没有明显的地理结构。我们的结果和 Cai 等的报道一致。主要原因可能与小桐子种质的扩散历史有关，因为小桐子原产南美洲，100 多年前传入亚洲和我国，由于小桐子生长迅速、容易扩散，加上不同地区人们的交叉引种，使得生长相同地区的种质混杂、生存历史短，因此没有明显的地理结构。本文报道的小桐子种质遗传多样性低与我国及亚洲现存种质资源的来源相对单一应该有着必然的联系。进一步研究应该结合小桐子野生种质在南美原产地的遗传多样性调查，以探讨我国及亚洲小桐子种质资源遗传多样性低的历史成因。

［参 考 文 献］

丘华兴，1996. 中国植物志，第 44 卷第 2 分册［M］. 北京：科学出版社，148

陈冀胜，郑硕，1987. 中国有毒植物［M］. 北京：科学出版社，258

Basha SD, Sujatha EM, 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population specific SCAR markers [J]. *Euphoria*, **156**: 375—386

Cai Y, Sun DK, Wu GJ *et al.*, 2010. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm in China [J]. *Biomass & Bioenergy*, **34**: 1739—1750

Cardle L, Ramsay L, Milbourne D *et al.*, 2000. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants [J]. *Genetics*, **156**: 847—854

Carvalho CR, Clarindo WR, Prac MM *et al.*, 2008. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L.: an important biofuel plant [J]. *Plant Science*, **174**: 613—617

Doyle J, Doyle J, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemistry*, **19**: 11—15

Ellis JR, Burke JM, 2007. EST-SSRs as a resource for population genetics analysis [J]. *Heredity*, **99**: 125—132

Fairless D, 2007. Biofuel: The little shrub that could-maybe [J]. *Nature*, **449**: 652—655

Foidl N, Foidl G, Sanchez M *et al.*, 1996. *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua [J]. *Bioresource Technology*, **58**: 77—82

Gübitz GM, Mittelbach M, Trabi M, 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L [J]. *Bioresource Technology*, **67**: 73—82

Li WZ, Godzik A, 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. *Bioinformatics*, **22**: 1658—1659

Morgante M, Hanafey M, Powell W, 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes [J]. *Nature Genetics*, **30**: 194—200

Nicot N, Chiquet V, Gandon B *et al.*, 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 800—805

Qiu L, Yang C, Tian B *et al.*, 2010. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR marker in castor (*Ricinus communis* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, **10**: 278

Ranade SA, Srivastava AP, Rana TS *et al.*, 2008. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods [J]. *Biomass & Bioenergy*, **32**: 533—540

Sun QB, Li LF, Li Y *et al.*, 2008. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China [J]. *Crop Science*, **48**: 1865—1871

Tatikonda L, Wani SP, Kannan S *et al.*, 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant [J]. *Plant Science*, **176**: 505—513

Tóth G, Gáspári Z, Jurka J, 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis [J]. *Genome Research*, **10**: 967—981

Varshney RK, Thiel T, Stein N *et al.*, 2002. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **7**: 537—546

Wen M, Wang H, Xia Z *et al.*, 2010. Developmenrt of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. [J]. *BMC Research Notes*, **3**: 42

Yadav HK, Ranjan A, Asif M *et al.*, 2010. EST-derived SSR markers in *Jatropha curcas* L.: development, characterization, polymorphism, and transferability across the species/genera [J]. *Tree Genetics & Genomes*, **7**: 207—219